

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk

Einflüsse von Milieufaktoren auf die Sekundärfluoreszenz der Kerne von Herzmuskelzellen bei der Färbung mit Acridinorange

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

vorgelegt von

Konrad Straub

aus Bramsche bei Osnabrück

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

**Einflüsse von Milieufaktoren auf die
Sekundärfluoreszenz
der Kerne von Herzmuskelzellen
bei der Färbung mit Acridinorange**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Konrad Straub

aus Bramsche bei Osnabrück

Marburg 1965

Angenommen von der medizinischen Fakultät
der Universität Marburg
am 26. Juli 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan Professor Dr. med. H. HENSEL
Referent Privatdozent Dr. med. G. KORB
Correferent Professor Dr. med. P. GEDIGK

I n h a l t

	Seite
I. Einleitung.	1
II. Material und Methodik.	2
III. Die normale Sekundärfluoreszenz des Herzmuskels bei einer AO - Fluorochromierung.	3
IV. Eigene Untersuchungen.	4
A. Beziehungen zwischen der Schnitttherstellung und der Sekundärfluoreszenz der Herzmuskelkerne.	
B. Der Einfluß von Variationen bei der Fluorochromierung auf die Sekundärfluoreszenz der Herzmuskelkerne.	6
1. Alter der Farblösung.	6
2. Temperatur der Farblösung.	7
3. Ionenstärke des verwendeten Puffers.	8
C. Die Sekundärfluoreszenz der Kerne in geschädigten Herzmuskelzellen.	10
D. Lichtoptische Kontrolluntersuchungen.	11
V. Diskussion.	12
1. Theorie der AO - Fluorochromierung.	
2. Besprechung der eigenen Befunde.	14
VI. Zusammenfassung.	17
VII. Literatur.	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153508_0050

I. Einleitung

Seit den Untersuchungen Struggers (1949) ist bekannt, daß nekrobiotische Vorgänge durch eine Acridinorange (AO) - Fluorochromierung früher und z.T. auch besser als mit anderen lichtoptischen Methoden zu erfassen sind. Diese Befunde wurden in der Zwischenzeit von anderen Untersuchern bestätigt; allerdings sind die Ergebnisse nicht einheitlich. Während Strugger bei Absterbevorgängen in pflanzlichen Geweben eine zunehmende Rotfluoreszenz des Cytoplasma beobachtete und als Ursache hierfür eine vermehrte Acridinorangebindung an desorganisierte Eiweißmizellarstrukturen annimmt, sind intravital geschädigte Herzmuskelzellen sowie Leber- und Nierenzellen unter bestimmten Umständen nicht durch eine Rot- sondern durch eine Grünfluoreszenz gekennzeichnet (Haraszti und Korb 1964, Hecht, Korb und David 1962, Korb und Knorr 1962, Korb und Totović 1963, Runge und Mitarb. in Vorbereitung).

Neben einer Änderung der Cytoplasmafluoreszenz wird von zahlreichen Autoren auch das Auftreten einer roten Zellkern- Fluoreszenz nach einer AO- Fluorochromierung als Ausdruck einer Zellschädigung angesehen (Bleyl 1961, 1962, Deckart 1961, Korb 1958, Molz 1956, Müller 1955, Roschlau 1962, Wittekind und Vöcker 1957). Bei ausgedehnten Untersuchungen am Herzmuskel zeigt es sich jedoch, daß aus zunächst unklaren Gründen auch in Schnitten ungeschädigter Herzen relativ häufig eine rötliche Kernfluoreszenz zu beobachten war. Da die Annahme nahe lag, daß diese rote Kernfluoreszenz bereits durch die Vorbehandlung der Gewebe und Vorgänge bei der Fluorochromierung hervorgerufen wurde, schien es lohnenswert, folgende Fragen zu klären:

1. Bestehen Beziehungen zwischen der Art der Schnitttherstellung und der Sekundärfluoreszenz der Herzmuskelkerne,
2. Lassen sich durch Modifikationen bei der Fluorochromierung Änderungen der Kernfluoreszenz erzeugen ?
3. Wie verhält sich die Sekundärfluoreszenz der Herzmuskelkerne nach einer intravitalen Schädigung ?

II. Material und Methodik.

Insgesamt wurden die Herzen von 50 Ratten untersucht. Da es bekannt ist, daß bei fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen am Herzmuskel nur an unfixierten Schnitten optimale Ergebnisse zu erzielen sind, (Korb, Buschmann und Bausdorf 1961, Korb und Hecht 1962), erfolgten die Untersuchungen an unfixierten, entweder mit der Messertiefkühlmethode (Schultz-Brauns 1931, 1932) oder mit dem Kryostaten (Pearse 1960) hergestellten Schnitten. Der Rest der Herzen wurde jeweils in neutralem Formalin fixiert.

Die Fluorochromierung mit Acridinorange wurde für die Grundversuche wie folgt vorgenommen:

Unfixierte Schnitte wurden zunächst fünf Minuten in isotonischem Michaelispuffer (pH 4,0 oder pH 6,0) eingebracht, danach zehn Minuten in gepufferter Acridinorangelösung gefärbt (Konzentration der Lösung 1 : 10 000, mit Michaelispuffer auf pH 4,0 oder pH 6,0 eingestellt), mit Pufferlösung (pH 4,0 oder pH 6,0) zehn Minuten gespült, eingedeckt und mit Paraffin umrandet,

An anderen Schnitten wurde die Feulgenreaktion, die Gallocyanin - Chromalaun-Färbung und die Methylgrün - Pyroninfärbung durchgeführt. Schließlich wurden formalinfixierte Paraffinschnitte mit Hämatoxylin - Eosin gefärbt.

Das Fluoreszenzmikroskop war mit einem Quecksilberhöchstdruckbrenner vom Typ HBO 200 ausgerüstet. Die Filterkombination bestand aus BG12 und OG 1 Filtern.

III. Die normale Sekundärfluoreszenz des Herzmuskels bei einer AO - Fluorochromierung.

Wurden nach der Messertiefkühlmethode hergestellte Herzmuskelschnitte in der angegebenen Weise mit AO fluorochromiert, so ergab sich in guter Übereinstimmung mit den Befunden von Korb und Hecht (1962) sowie Korb, Buschmann und Bausdorf (1961) folgendes Bild:

AO pH 4,0 Die Kerne der Muskelzellen leuchten grün bis gelbgrün, die übrige Zelle mattgrün. Diese Fluoreszenz geht in erster Linie von den Myofibrillen aus. Eine Querstreifung ist nicht zu erkennen. Die Kerne der interstitiellen Zellen besitzen eine mattgrüne Sekundär - Fluoreszenz. Das perivaskuläre Bindegewebe ist grün gefärbt. Vereinzelt sind Mastzellen mit kupferroten Granula vorhanden.

AO pH 6,0 Die Kerne der Muskelzellen zeigen bei diesem pH - Wert in Messertiefkühlschnitten meistens eine grüne bis gelbgrüne, in Kryostatschnitten da-

gegen häufig eine orangerote Fluoreszenz. Die Myofibrillen weisen eine gelbgrüne Farbe auf. Mehrfach stellen sich, besonders in Kernnähe, unscharf abgegrenzte, schwach orangefarbene Areale dar. Bindegewebsfasern fluoreszieren wie bei pH 4,0 grün, Mastzellengranula kupferrot.

IV. Eigene Untersuchungen.

A. Beziehungen zwischen der Schnittherstellung und der Sekundärfluoreszenz der Herzmuskelkerne.

Zunächst wurde die Sekundärfluoreszenz der Muskelzellkerne in 10 μ und 20 μ dicken, nach der Messertiefkühlmethode und mit dem Kryostaten hergestellten Schnitten verglichen. Die Färbung erfolgte unmittelbar nach dem Schneiden. Die Temperatur der Lösungen betrug 18° C. Die Muskelzellkerne leuchteten jeweils einheitlich, es waren also innerhalb eines Herzens keine Unterschiede zu beobachten. Insgesamt wurden 30 Herzen untersucht. Dabei konnten folgende Befunde erhoben werden: (Die Zahlen geben an, wieviel Herzen eine bestimmte Kernfluoreszenz zeigten):

1. Puffer- und Farblösung pH 4,0

a. Kryostatschnitte

Farbe der Herzmuskelkerne

Dicke der Schnitte	grün	gelbgrün	gelb	gelborange	orangerot
10 μ	-	3	7	<u>17</u>	3
20 μ	3	5	<u>15</u>	7	-

b. Messertiefkühlschnitte

Dicke der Schnitte	grün	gelbgrün	gelb	gelborange	orangerot
10 μ	<u>13</u>	9	8	-	-
20 μ	<u>19</u>	8	3	-	-

2. Puffer- und Farblösung pH 6,0

a. Kryostatschnitte

Farbe der Herzmuskelkerne

Dicke der Schnitte	grün	gelbgrün	gelb	gelborange	orangerot
10 μ	-	-	2	2	<u>26</u>
20 μ	-	2	4	<u>17</u>	7

b. Messertiefkühlschnitte

Dicke der Schnitte	grün	gelbgrün	gelb	gelborange	orangerot
10 μ	-	3	<u>17</u>	10	-
20 μ	7	<u>19</u>	4	-	-

Diese Ergebnisse zeigen, daß bereits durch eine Schnittherstellung mit dem Kryostaten in einem hohen Prozentsatz eine gelborange bis orangefarbene Sekundärfluoreszenz der Herzmuskelkerne zu beobachten ist. Dieser Befund war bei 10 μ dicken Schnitten deutlicher ausgeprägt als bei einer Schnittdicke von 20 μ .

Zu besseren Ergebnissen führte die Schnittherstellung nach der Messertiefkühlmethode; allerdings trat auch hierbei bei einer Schnittdicke von 10 μ bei pH 6,0 in 10 der 30 Herzen eine gelborangefarbene Sekundärfluoreszenz auf.

Da die $20\ \mu$ dicken Schnitte jeweils zuerst hergestellt wurden, lag die Vermutung nahe, daß eine Beziehung zum Gefriervorgang bestand. In entsprechenden Versuchen konnte diese Annahme bestätigt werden: Lässt man Herzmuskulatur mehrfach einfrieren und auftauen, so zeigen die Muskelkerne unabhängig von der Art der Schnittherstellung generell eine rötliche Sekundärfluoreszenz. Wurde dagegen der Herzmuskel nur einmal eingefroren und dann nach der Messertiefkühlmethode geschnitten, so leuchteten die Zellkerne mit großer Regelmäßigkeit sowohl bei pH 4,0 als auch bei pH 6,0 in einem grünen bis gelbgrünen Farbton, während in Kryostatschnitten weiterhin häufig orangerote Kerne vorlagen. Diese Erkenntnis wurde bei allen weiteren Versuchen berücksichtigt.

B. Der Einfluß von Modifikationen bei der Fluorchromierung mit AO auf die Sekundärfluoreszenz der Herzmuskelkerne.

1. Alter der Farbstofflösung.

Schnitte von 5 Herzen wurden jeweils mit AO-Lösungen behandelt, die einmal frisch zubereitet waren, zum anderen im Kühlschrank bei 4°C oder bei Zimmertemperatur 7 Tage gelagert hatten. Die Untersuchung erfolgte an $10\ \mu$ dicken, nach einmaligem Einfrieren mit der Messertiefkühlmethode hergestellten Schnitten.

a. Puffer- und Farblösung pH 4,0

<u>Art der Lösung</u>	<u>Farbe der Herzmuskelkerne</u>
frisch zubereitet	gelbgrün
7 Tage bei 4°C	gelbgrün
7 Tage bei 20°C	gelbgrün

b. Puffer- und Farblösung pH 6,0

<u>Art der Lösung</u>	<u>Farbe der Herzmuskelkerne</u>
frisch zubereitet	gelbgrün bis gelb
7 Tage bei 4° C	gelbgrün bis gelb
7 Tage bei 20° C	gelb bis gelborange

Diese Versuche zeigen also, daß Alter und Temperatur einer AO- Lösung die Kernfluoreszenz beeinflussen können.

2. Temperatur der Farblösung.

Um weiter zu klären, ob nicht schon die Temperatur der AO- Lösung allein ausreicht, um eine rote Kernfluoreszenz entstehen zu lassen, wurden die Herzen von fünf Tieren mit einer frisch zubereiteten Farblösung gefärbt, die zum Teil auf 4° C und zum Teil auf 37° C eingestellt war. Die Schnitte wurden mit der Messertiefkühlmethode nach einmaligem Einfrieren hergestellt.

a. Puffer- und Farblösung pH 4,0

Farbe der Herzmuskelkerne bei Lösungen von

<u>Dicke der Schnitte</u>	<u>4° C</u>	<u>37° C</u>
10 μ	grün	orange

b. Puffer- und Farblösung pH 6,0

Farbe der Herzmuskelkerne bei Lösungen von

<u>Dicke der Schnitte</u>	<u>4° C</u>	<u>37° C</u>
10 μ	gelbgrün	orangerot-rotorange

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß hauptsächlich die Temperatur und weniger das Alter einer AO- Lösung den Ausfall der Kernfluoreszenz bestimmen kann.

Somit lag es nahe, zu prüfen, ob auch die Temperatur, bei der die Schnitte vor der Färbung aufbewahrt werden, von Bedeutung ist. Hierzu wurden Gefriermikotomschnitte derselben Tiere vor der Färbung bei einer Außentemperatur von 20° C und 37° C mehrere Stunden gelagert: Bei 20° C konnten nach drei Stunden, bei 37° C bereits nach einer Stunde orangerote Muskelkerne beobachtet werden, wenn die Fluorochromierung auf übliche Weise erfolgte.

Die Versuche weisen darauf hin, daß bei der AO- Fluorochromierung von Herzmuskelschnitten die Kernfluoreszenz nicht nur von der Temperatur der Farblösung, sondern unter Umständen auch von der Temperatur, bei der die Schnitte aufbewahrt wurden, abhängt.

3. Ionenstärke des verwendeten Puffers.

Da auf die Bedeutung der Ionenstärke einer Pufferlösung für den Ausfall der Sekundärfluoreszenz bereits mehrfach hingewiesen wurde (Roschlau und Bausdorf 1963, Zeiger 1949, 1958), wurden die Herzen von fünf Ratten unter Verwendung hypo-, iso-, und hypertotonischer Pufferlösung (Michaelis-Puffer) nach einmaligem Einfrieren und Schnittherstellung nach der Messertiefkühlmethode gefärbt. Die Lösungen wurden alle auf pH 6,0 eingestellt.

a. Farbung mit hypotonischer Lösung

Farbe der Herzmuskelkerne bei

Dicke der Schnitte	Kryostatatschnitten	Gefriermikrotom- schnitten
10 μ	orangerot	orange

b. Farbung mit isotonischer Lösung

Farbe der Herzmuskelkerne bei

Dicke der Schnitte	Kryostatatschnitten	Gefriermikrotom- schnitten
10 μ	gelborange	gelbgrün - gelb

c. Farbung mit hypertotonischer Lösung

Farbe der Herzmuskelkerne bei

Dicke der Schnitte	Kryostatatschnitten	Gefriermikrotom- schnitten
10 μ	grün bis gelbgrün	grün bis gelbgrün

Aus den Untersuchungen geht somit hervor, daß auch die Ionenstärke der Pufferlösung von großer Bedeutung für den Ausfall der Kernfluoreszenz ist. Wie die Untersuchungen zeigen, sind die besten Ergebnisse bei Verwendung hypertotonischer Pufferlösungen zu erzielen.

C. Die Sekundärfluoreszenz der Kerne in geschädigten Herzmuskelzellen.

Für diese Untersuchungen erhielten 10 Ratten eine einmalige subcutane Injektion von 75 mg Aludrin / kg Körpergewicht gelöst in 1ml phys. Kochsalzlösung. Je 2 Tiere wurden nach 2, 3, 4, 8 und 12 Stunden durch Nackenschlag getötet. Die Färbung der sofort hergestellten 10 μ dicken Messertiefkühlschnitte erfolgte mit hypertonschen, auf pH 6,0 eingestellten Lösungen.

Wie die Untersuchungen von Korb und Totović (1963) zeigen, entstehen wenige Stunden nach der Aludrininjektion in der inneren, d.h. endocardnahen Schicht beider Ventrikel mit großer Regelmäßigkeit herdförmige Muskelzelluntergänge.

Bei einer AO- Fluorochromierung stellen sich erstmals 2 Stunden nach der Injektion nekrobiotische Herzmuskelzellen dar. Sie heben sich durch eine grünliche Fluoreszenz und eine homogene Umwandlung des Cytoplasmas von den übrigen Muskelzellen ab. Seltener nimmt das Cytoplasma auch eine schollige Beschaffenheit an. Die Ausdehnung der so veränderten Muskelzellherde nimmt in den nächsten Stunden zu. Nach 8 Stunden beginnen ortsständige Bindegewebezellen zu wuchern. Zum selben Zeitpunkt zerfällt ein Teil der geschädigten Muskelzellen in unregelmäßige Schollen.

In keinem Stadium der Nekrose konnte eine Rotfluoreszenz der Zellkerne beobachtet werden. Die Kerne leuchten wie in ungeschädigten Muskelzellen grün bis gelbgrün, allerdings nimmt die Intensität der Fluoreszenz laufend ab, bis schließlich nach etwa 8 bis 12 Stunden in den nekrotischen Muskelzellen keine Kerne mehr zu erkennen sind.

Damit werden Beobachtungen, nach denen auch in der Infarktnekrose rötliche Muskelzellkerne nur selten auftreten, (Hecht, Korb und David 1961), bestätigt. Es kann somit festgestellt werden, daß - jedenfalls im Herzmuskel - nekrobiotische Zellveränderungen bei einer AO- Fluorochromierung in der Regel nicht mit dem Auftreten einer rötlichen Kernfluoreszenz einhergeht.

D. Lichtoptische Kontrolluntersuchungen.

Wie die Untersuchungen zeigen, kann die Sekundärfluoreszenz der Muskelzellkerne bei einer AO- Fluorochromierung durch eine Reihe von Faktoren, wie Schnittdicke, mehrmaliges Einfrieren, Temperatur der Farblösung und Temperatur bei der Schnittlagerung beeinflußt werden. Daneben fiel auf, daß Abweichungen von der normalen grünen bis gelbgrünen Kernfluoreszenz in Kryostatschnitten häufiger nachweisbar sind als in Messertiefkühlschnitten. Ähnliche färberische Unterschiede waren weder bei der Feulgen - Reaktion, der Galloeyanin - Chromalaun - oder der Methylgrün - Pyronin - Färbung festzustellen.

Dagegen war zu bemerken, daß lichtoptisch besonders in nachträglich mit Formalin fixierten Kryostatschnitten und zwar dann, wenn gleichzeitig eine rötliche Kernfluoreszenz vorlag, vielfach deutliche Kernvakuolen, d.h. morphologische Veränderungen in den Kernen zu erkennen waren.

V. Diskussion

1. Theorie der AO - Fluorochromierung.

Zur Besprechung der Ergebnisse ist es notwendig, auf einige theoretische Grundlagen der AO- Fluorochromierung kurz einzugehen :

Acridinorange ist ein wasserlöslicher Fluoreszenzfarbstoff von basischem Charakter. Er ist in saurer und neutraler Lösung mit einem Maximum bei pH 6,5 dissoziiert (Kölbel 1947). Die Kurve der Dissoziation fällt ab pH 8,0 steil ab, so daß ab pH 9,0 der Farbstoff nur noch in molekularer Form vorliegt. In diesem Zustand hat Acridinorange lipophile Eigenschaften, während die Kationen im sauren und neutralen Bereich hydrophil sind.

Basische Lösungen fluoreszieren unabhängig von der Konzentration im Ultraviolett- und Blaulicht gelbgrün, dagegen weist die Fluoreszenz von Lösungen, in denen die dissoziierte Form überwiegt, bei niedrigen Konzentrationen (1:100 000) eine grüne, bei hohen (1:100) eine rote Fluoreszenz auf. Dieser "Konzentrationsseffekt" wurde zuerst von Strugger (1949) beschrieben. Die Ursache liegt nach Scheibe und Zanker in einer Assoziatbildung der Kationen.

Zur Fluorochromierung von Zellen und Geweben verwendet man zweckmäßig Farblösungen, die auf pH Werte zwischen 1,5 und 8,0 eingestellt

sind, weil in diesem Bereich das Acridinorange in der dissoziierten Form vorliegt. Durch geeignete Vorbehandlung können gleichzeitig verschiedene Zell- und Gewebselemente durch eine unterschiedliche Sekundärfluoreszenz dargestellt werden (Haitinger 1959, de Lerma 1958, Schümmelfeder 1948, 1950).

Aus den Untersuchungen Struggers (1949) ergibt sich, daß Zell- und Gewebselemente, die reichlich Acridinorange kationen binden, rot fluoreszieren. Ist das Material hingegen gering mit Acridinorange kationen beladen, leuchtet es grün.

Da das Acridinorange zur Gruppe der basischen Fluorochrome gehört, erfolgt die Bindung in erster Linie an freie saure Valenzen. Es besteht eine besondere Affinität zu Ribonukleinsäuren und zu sauren Mucopolysacchariden. Die Anlagerung kann auf verschiedene Weise erfolgen: 1. elektrostatisch unter Bildung salzartiger Komplexe, 2. durch Oberflächenadsorption (van der Waal'sche Kräfte), 3. durch Ionenaustausch an amphotere Eiweiße.

Die Darstellung von Ribonukleinsäuren mit Acridinorange hat als fluoreszenzmikroskopische Nachweismethode große Bedeutung erlangt (Armstrong 1956, von Bertalanffy 1956, Gössner 1949, Haitinger 1959, Mayersbach 1956, Deckart und Korb 1962, Schümmelfeder 1950, Schümmelfeder, Ebschner und Krogh 1957, Zeiger und Wiede 1954). Dabei sollen nach Schümmelfeder, Krogh und Ebschner (1958) die Farbstoffkationen an die Phosphorsäuregruppe der Nukleinsäuren unter Bildung salzartiger Komplexe gebunden werden.

Während mit extrem saurer Acridinorange-lösung die RNS und DNS grün, bzw. gelbgrün leuchten, nimmt mit steigendem pH Wert die RNS eine orangerote Sekundärfluoreszenz an, während die DNS weiterhin grün bis gelbgrün gefärbt bleibt. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die Sekundärfluoreszenz der DNS weitgehend vom Polymerisationsgrad abhängt. Die normalerweise hochpolymerisierte DNS der Zellkerne leuchtet, wie erwähnt, grün bis gelbgrün. Tritt eine Depolymerisation ein, was u.a. durch eine Formalinfixierung,

hypotonische Kochsalzlösungen und eine geringe Autolyse erzielt werden kann, werden nach Schümmelfeder, Krogh und Ebschner (1958) Hydroxyl- und Aminogruppen frei, die eine zusätzliche Aufnahme von Acridinorange kationen ermöglichen und damit eine Rotfluoreszenz bewirken. Demnach ist es also theoretisch durchaus möglich, geringe Zellschädigungen, die mit einer Depolymerisation der DNS einhergehen, durch eine Änderung der Kernfluoreszenz zu erkennen, wie es u.a. von Bleyl (1962), Deckart (1961), Korb (1958), Molz (1956), Roschlau (1962), Wittekind und Völcker (1957) beschrieben wird.

2. Besprechung der eigenen Befunde.

Die eigenen Versuche ergaben, daß bereits in Schnitten ungeschädigter Herzen nach einer Acridinorangefluorochromierung die normalerweise grün fluoreszierenden Kerne einen orange bis orangefarbenen Farbton annahmen. Dieser Farbeffekt trat besonders deutlich zutage

1. in Kryostatschnitten,
2. durch mehrmaliges Einfrieren,
3. nach einer längeren Lagerung der Schnitte bei 20° C und 37° C,
4. nach einer Färbung mit erwärmter Farblösung und
5. bei Verwendung hypotonischer Pufferlösungen.

Wie sind diese Befunde zu erklären? Zunächst muß daran gedacht werden, daß der Gefrier- und Abtauvorgang zu Veränderungen im Kerngefüge führt. Besonders durch die Untersuchungen von Neumann (1958) ist bekannt, daß beim Einfrieren von Geweben Eiskristalle entstehen können. Sie bilden sich aus freiwerdendem Hydratationswasser, das normalerweise elektrisch geladene Seitenketten

großer Molekülkomplexe sowie freie Ionen umgibt. Die Zahl und die Größe der Eiskristalle hängt von der Geschwindigkeit des Einfrierens aber auch von der Temperaturdifferenz innerhalb der Gewebeblöcke ab. Nach dem Auftauen findet man bei sorgfältiger Fixierung anstelle der Eiskristalle sowohl im Zelleib als auch in den Kernen Vakuolen. Sie werden in unfixierten Schnitten durch Quellungsvorgänge verdeckt. Da bei unseren Versuchen besonders häufig in Kryostatschnitten sogenannte "Kernvakuolen" vorhanden waren, scheint die Schnittherstellung im Kryostaten mehr als bei der Messertiefkühlmethode mit der Bildung von Eiskristallen einherzugehen. Es liegt auf der Hand, daß es dabei zu Veränderungen der submikroskopischen Kernstrukturen kommen kann, die zu einer vermehrten Bindung von Acridinorangedkationen und damit zu einer Rotfluoreszenz führen.

Bei den anderen aufgeführten Punkten dürfte die Rotfluoreszenz der Kerne mit großer Wahrscheinlichkeit ganz entsprechende Ursachen haben. Wie bereits erwähnt, geben Schümmelfeder, Krogh und Ebschner (1958) an, daß die Sekundärfluoreszenz der Zellkerne nach einer Acridinorange-*fluoro*chromierung vorwiegend durch die Anwesenheit von DNS bedingt ist. Diese liegt normalerweise in hochpolymerisierter Form vor und kann in diesem Zustand nur verhältnismäßig wenige Acridinorangedkationen binden, deshalb kommt es nur zu einer grünen bis gelbgrünen Sekundärfluoreszenz. Tritt dagegen eine Depolymerisation ein - sie kann wie bereits erwähnt durch eine Behandlung mit warmem Wasser, durch eine Autolyse, aber auch durch die Einwirkung hypotoner Lösungen hervorgerufen werden - werden je nach dem Grad der Depolymerisation

mehr oder weniger Acridinorangedkationen angelagert: die Kerne leuchten dadurch gelborange bis rot.

Die Versuche zeigen also, daß - jedenfalls im Herzmuskel - eine rote Kernfluoreszenz nach einer AO - Fluorochromierung bereits durch zahlreiche Milieufaktoren bei der Schnittbehandlung und der Fluorochromierung selbst entstehen kann. Aus diesem Grunde muß davor gewarnt werden, eine Änderung der Kernfarbe nach orangerot von vornherein als Zeichen einer intravitalen Schädigung aufzufassen. Einigermäßen sichere Aussagen können nur dann gemacht werden, wenn die Schnitte unter optimalen Bedingungen hergestellt und gefärbt wurden. Solche Bedingungen sind dann erfüllt, wenn Herzmuskulatur unmittelbar nach dem Tode nach einmaligem Einfrieren nach der Messertiefkühlmethode geschnitten wird, wenn die Färbung mit frischen Farblösungen bei einer Temperatur unter 20° C erfolgt und wenn die verwendete Pufferlösung hyperton ist.

Während also im normalen Herzmuskel bereits orangerote Kerne auftreten können, ist auf der anderen Seite eine grüne oder gelbgrüne Kernfluoreszenz kein Beweis für das Vorliegen ungeschädigter Kerne. So ergab sich bei der Untersuchung hypoxämischer Herzmuskelnekrosen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (Hecht, Korb und David 1961, Korb und Totović 1963), daß in den untergehenden Muskelfasern weniger die Farbe als vielmehr die Intensität der Kernfluoreszenz geändert war.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen auf der einen Seite die große Empfindlichkeit der Fluoreszenzmikroskopie. Auf der anderen Seite weisen sie aber auch auf ihre Fehlermöglichkeiten hin. Sie zeigen mit aller Deutlichkeit, daß bei der Interpretation bestimmter Farbeffekte größte Zurückhaltung notwendig ist.

VI. Zusammenfassung.

Die AO- Fluorochromierung wird vielfach zur Erkennung von Frühveränderungen bei der Nekrobiose verwendet. In diesem Zusammenhang wird im Schrifttum darauf hingewiesen, daß rotleuchtende Kerne Ausdruck einer vorangegangenen Schädigung sind. In der vorliegenden Arbeit wird nachgewiesen, daß diese Ansicht zumindest für den Herzmuskel nicht gilt. Hier konnten vielmehr durch eine Reihe von Faktoren bei der Schnittherstellung und der AO-Fluorochromierung selbst rotleuchtende Kerne festgestellt werden. Dagegen zeigte sich, daß in einwandfrei intravital geschädigten Muskelzellen bei der vorschriftsmäßigen Schnittherstellung und Färbung zu keinem Zeitpunkt rot fluoreszierende Kerne auftreten. Die Versuche weisen also darauf hin, daß bei der Interpretation fluoreszenzmikroskopischer Farbeffekte besonders kritische Maßstäbe anzulegen sind.

Literatur

- Armstrong, A. Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence
Exp. Cell Research 11,640-642, 1956.
- Bethe, A. Die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf die Färbung und Färbbarkeit tierischer Gewebe.
Beitr.chem.Physiol.und Path. 6,399-425, 1905.
- Bertalanffy, L.von and A. Bickis Identification of cytoplasmatic basophilia (RNS) by fluorescence microscopy
J.Histochem. and Cytochem. 4,481-493, 1956.
- Bleyl, U. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an menschlichen Placenten
Zschr. Zellforsch. 56,404-424, 1962.
- Deckart, H. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Rattennieren nach Kältekonservierung
Acta biol. med. germ. 7,602-608, 1962.
- Deckart, H. und G. Korb Fluorochromierung mit Acridinorange und Cori-phosphin in Abhängigkeit vom pH Wert der Farblösung und Vorbehandlung der Schnitte am Beispiel der normalen Rattenniere.
Zschr. med.Labortechnik 3,251-259, 1962.
- Haitinger, M. Fluoreszenzmikroskopie
2. Auflage Leipzig 1959.
- Haraszti, A. und G. Korb Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Leberzellnekrosen
Zschr. Ges.Inn.med. u.Grenzgebiete 19,129-130, 1964.
- Hecht, A., G.Korb Vergleichende histochemische, fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes der Ratte Virchows Archiv path. Anat.334, 267-284, 1961.
- Kölbel, K. Untersuchungen über quantitative Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Zellen und ihre Beziehungen zu den elektrischen Verhältnissen der lebenden und toten Plasmaeiweißkörper
Inaug.Diss.Technische Hochschule Hannover 1947.
- Korb, G. und A.Hecht Der Einfluß der Autolyse auf das fluoreszenzmikroskopische Erscheinungsbild des experimentellen Herzinfarktes bei der Ratte.
Verh.Dtsch. Ges.Path. 45.Tagung 331-332, 1961.
- Korb, G., R.Buschmann B. Bausdorf Der Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf die Sekundärfluoreszenz des Herzmuskels bei Färbungen mit AO und CO
Zschr. med. Labortechnik, 2,243-253, 1961.

- Korb, G., A. Hecht Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am normalen Herzmuskel
Zschr.mikroskop.anat.Forsch. 68,221-228, 1962.
- Korb, G. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Befunde am Herzmuskel bei der akuten Leuchtgasvergiftung.
Dtsch.Zschr.gerichtl.Med.52, 357-368, 1962.
- Korb, G., H. David Fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen am Herzmuskel der Ratte nach Leuchtgasvergiftung
Dtsch.Zschr.gerichtl.Med.52, 549-557, 1962.
- Korb, G. und G.Knorr Vergleichende licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen frischer Herzmuskel-schäden beim Menschen.
Virchows Arch.path.Anat. 335, 158-164, 1962.
- Korb, G. und H.David Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Mitochondrien im Herzmuskel.
Zschr.mikroskop.anat.Forsch.62, 121-126, 1962.
- Korb, G. Das Verhalten der normalen und geschädigten Froschleber bei der Färbung mit dem Fluorochrom Acridinorange.
Acta biol.et.med.german.1,6 725-732, 1958.
- Korb, G.und V.Totović Licht- und fluoreszenzmikroskopische Befunde am Herzmuskel nach einer akuten, kurzfristigen Coronarinsuffizienz
Virchows Arch.path.Anat.336, 475-484, 1963.
- de Lerma, B. Die Anwendung von Fluoreszenzlicht in der Histochemie
W.Graumann und Neumann, K.H.Handbuch der Histochemie I/1 Allgemeine Methodik 78-159
Stuttgart 1958.
- Levine, L. The Cell in Mitosis.Proceedings of the first annual symposion of the Wayne State Fund Research Recognition Award.Edited by Lawrence Levine
New York and London Academic Press 1963.
- Lipp Histochemische Methoden Lieferung II
R.Oldenburger München 1954 Lieferung XIV 1957.
- Mayersbach, H. Über die Spezifität der Färbung zum Nachweis der Ribonukleoproteide
Acta histochemica 3, 128-137, 1956.
- Molz, G. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen experimenteller hypoxämischer Nierenschädigungen
Virchows Arch.path.Anat.328, 111-120, 1956.
- Müller, E. Der Zelltod. Handbuch der Allgemeinen Pathologie. Band II Das Cytoplasma 613-679, 1955.

- Naylor, E.E. The hydrogen ion concentration and the staining of plant tissue
Amer.J.Bot. 13,265, 1926.
- Pearse, A. Histochemistry Theoretical And Applied
Boston 1960.
- Neumann, K. Das Verhalten der Gewebe unter der Gefrier-
trocknung
Handbuch der Mistochemie I 19-24, Stuttgart
1958.
- Pirocynsky, B. und L.von Bertalanffy Ribonucleic acid in cytoplasm of liver cells
Arch.Path. 54, 450-455, 1952.
- Pischinger, P. Die Lage des IEP histologischer Elemente als
Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit.
Zschr.Zellforsch. 3, 169-197, 1926.
- Roschlau, G. Fluoreszenzmikroskopische Befunde an der Rat-
tenleber nach akuter Tetrachlorkohlenstoff-
vergiftung
Virchows Arch.path.Anat. 336, 122-131, 1962.
- Roschlau, G. Über den Einfluß des Ionenmilieus auf die
B. Bausdorf Acridinorange-Fluoreszenz verschiedener fixier-
ter und unfixierter Gewebe
Zschr.med.Labortechnik, 4,91-98, 1963.
- Schultz-Brauns, O. Verbesserungen und Erfahrungen bei Anwendung
der Methode des Gefrierschneidens unfixierter
Gewebe.
Centralblatt f.allg.Path.und patholog.Anat.
54, 225-234, 1932.
- Schultz-Brauns, O. Eine neue Methode des Gefrierschneidens für
histologische Schnelluntersuchungen.
Klin.Wschr.10, 113-117, 1931.
- Schümmelfeder, N. Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit
Acridinorange
Naturwissenschaften 35, 346, 1948.
- Schümmelfeder, N. Die Fluorochromierung des lebenden, überleben-
den und toten Cytoplasmas mit dem basischen
Farbstoff Acridinorange und ihre Beziehungen
zur Stoffwechselaktivität der Zelle
Virchows Arch.path.Anat. 318, 119-154, 1950.
- Schümmelfeder, N. Strukturänderungen des Protoplasmas bei dem
Absterben der Zelle
Verh.Dtsch.Ges.Path.33, 65-69, 1950.

- Schümmelfeder, N. Zur Biologie und Histologie tierischer Geschwülste
Verh.Dtsch.Ges.Path. 35, 141-144, 1951.
- Schümmelfeder, N. Über die Bestimmung des Umladebereichs von Gewebeelementen mit dem Fluorochrom Acridinorange
Naturwissenschaften 42, 442, 1955.
- Schümmelfeder, N.
K.J. Ebschner und
E. Krogh Die Grundlagen der differentiellen Fluorochromierung von Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren mit Acridinorange
Naturwissenschaften 44, 35, 1957.
- Schümmelfeder, N. Fluoreszenzmikroskopische Histochemie und Farbfotografie
Photographie u.Wissensch. 6, 19-24, 1957.
- Schümmelfeder, N. Histochemical significance of the polychromatic fluorescence induced in tissues stained with acridinorange
J.Histochem.and Cytochem. 6, 392-393, 1958.
- Schümmelfeder, N. Histochemische Bedeutung der Fluoreszenzmetachromasie des Acridinorange
Acta histochem.Suppl. 1, 148-151, 1958.
- Schümmelfeder, N.
E. Krogh, K.J.Ebschner Färbungsanalysen zur Acridinorange-Fluorochromierung. Vergleichende histochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Kleinhirn der Maus mit Acridinorange und Galloxyanin-Chromalaunfärbungen
Zschr.Zellforsch.Abt.Histochem. 1, 1-28, 1958.
- Strugger, S. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie
Hannover 1949.
- Wittekind, D.
A. Völcker Zur Frage intraplasmatischer Granulabildung nach Vitalfärbung mit Acridinorange.
Untersuchung am Mäuseascitescarcinom.
Protoplasma 47, 535-545, 1957.
- Zeiger, K. und
M. Wiede Die Speicherung des Acridinorange in der Froschleber und ihr Einfluß auf das Ausscheidungsvermögen der Leberzelle
Zschr.Zellforsch. 40, 401-424, 1954.

Lebenslauf.

1938 wurde ich in Bramsche bei Osnabrück als Sohn des Dr.med.H.H.Straub geboren. Die Schulausbildung erfolgte auf der Volksschule in Bramsche, dem Ratsgynasium in Osnabrück und der Paul Gerhardt-Schule in Dassel. Dort legte ich 1959 das Abitur ab und studierte anschließend Medizin. Davon verbrachte ich sechs Semester an der Universität Würzburg, ein Semester in Wien, darauf zwei Semester in Marburg. Hier begann ich am Pathologischen Institut die Doktorarbeit. Das Medizinstudium schloß ich nach zwei Semestern in Tübingen mit dem Staatsexamen im Dezember 1964 ab.

Ab Januar 1965 bin ich als Medizinalassistent, zuerst für 6 Monate, in der chirurgischen Abteilung der Städtischen Krankenanstalten in Osnabrück tätig.

Meine akademischen Lehrer waren in Würzburg die Herren Prof.Dr.Altmann, Prof.Dr.Bauereisen, Doz.Dr.Cretius, Prof.Dr.Fischer, Prof.Dr.Krause, Doz.Dr.Kuschke, Prof.Dr.Kulenkampff, Prof.Dr.Müller, Prof.Dr.Naumann, Prof.Dr.Neubert, Prof.Dr.Neumann, Prof.Dr.Roedig, Prof.Dr.Schneider, Prof.Dr.Simonis, Prof.Dr.Steinhardt, Prof.Dr.Turba, Prof.Dr.Wachsmuth, Prof.Dr.Wollheim, Doz.Dr.Wüstenfeld.

In Wien die Herren Prof.Dr.Antoine, Prof.Dr. Böck, Doz.Dr.Braitenberg, Prof.Dr.Fuchsig, Prof.Dr. Hoff, Prof.Dr.Lauda, Doz.Dr.Neuhold, Prof.Dr.Obiditsch Mayer.

In Marburg die Herren Prof.Dr.Berendes, Prof. Dr.Braun-Falco, Prof.Dr.Förster, Prof.Dr.Gedigk, Prof.Dr.Hamm, Prof.Dr.Hartmann, Doz.Dr.Hildebrandt, Prof.Dr.Hornung, Prof.Dr.Huber, Prof.Dr.Jakob, Prof.Dr.Linneweh, Prof.Dr.Lübberts, Doz.Dr.von Mangerkönig, Prof.Dr.du Mesnil de Rochemont, Doz.Dr.Nieth, Prof.Dr.Prinz, Prof.Dr.Schadewaldt, Prof.Dr.Schmid, Prof.Dr.Schölmerich, Prof.Dr.Siegert, Prof.Dr.Streicher.

In Tübingen die Herren Prof.Dr.Betke, Prof.Dr. Bock, Prof.Dr.Goessner, Prof.Dr.Heni, Prof.Dr.Lembeck, Prof.Dr.Letterer, Prof.Dr.Mau, Prof.Dr.Möricke, Prof.Dr.Wundt.

